



MINISTERIO  
DE INDUSTRIA, TURISMO  
Y COMERCIO

PCT/EP200 4 / 007 195

REC'D 08 NOV 2004

WIPO

PCT



Oficina Española  
de Patentes y Marcas

## PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

# CERTIFICADO OFICIAL

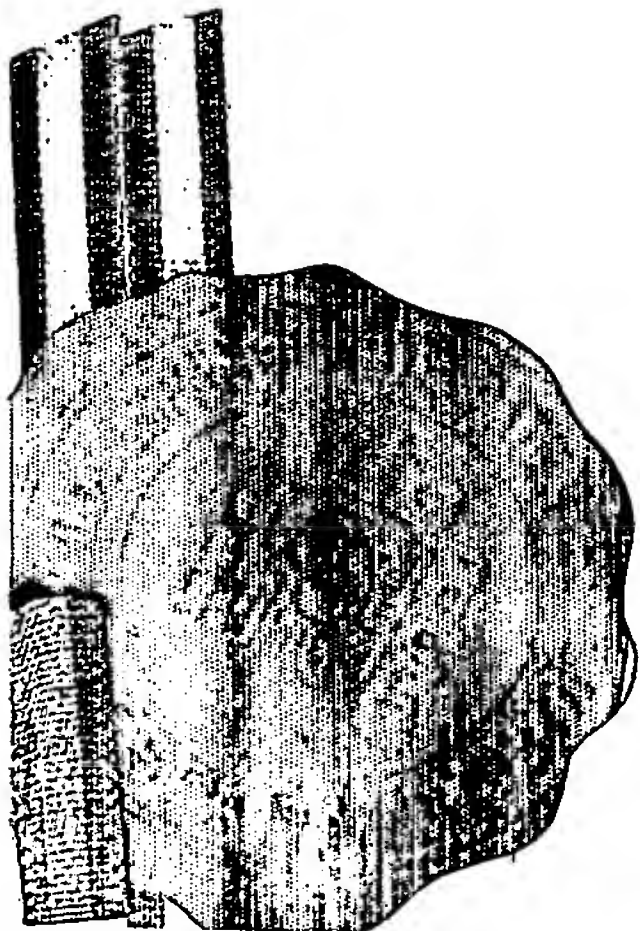
Por la presente certifico que los documentos adjuntos son copia exacta de la solicitud de PATENTE de INVENCION número 200301518 , que tiene fecha de presentación en este Organismo 30 de Junio de 2003

Madrid, 15 de Octubre de 2004

El Director del Departamento de Patentes  
e Información Tecnológica

P.D.

Mª DEL MAR BIARGE MARTINEZ



NOT AVAILABLE COPY



MINISTERIO  
DE CIENCIA  
Y TECNOLOGIA



Oficina Española  
de Patentes y Marcas

PC1/EP200 4 / 00 / 195  
INSTANCIA DE SOLICITUD

NUMERO DE SOLICITUD

P200301518

REC'D 08 NOV 2004

WIPO

PC

JUN 30 11 59

FECHA Y HORA DE PRESENTACIÓN EN LA O.E.P.M.

FECHA Y HORA PRESENTACIÓN EN LUGAR DISTINTO O.E.P.M.

(4) LUGAR DE PRESENTACIÓN  
MADRID

CÓDIGO  
28

(1) MODALIDAD

☒ PATENTE DE INVENCION

☐ MODELO DE UTILIDAD

(2) TIPO DE SOLICITUD

☐ ADICIÓN A LA PATENTE

☐ SOLICITUD DIVISIONAL

☐ CAMBIO DE MODALIDAD

☐ TRANSFORMACIÓN SOLICITUD PATENTE EUROPEA

☐ PCT: ENTRADA FASE NACIONAL

(3) EXPED. PRINCIPAL O DE ORIGEN:  
MODALIDAD PATENTE INV

NUMERO SOLICITUD

FECHA SOLICITUD 30/06/2003

(5) SOLICITANTE(S): APELLIDOS O DENOMINACIÓN SOCIAL

NOMBRE

NACIONALIDAD

CÓDIGO PAÍS

DNI/CIF

CNAE

PYME

MEDPLANT GENETICS, S.L.

ESPAÑOLA

ES

B95091799

(6) DATOS DEL PRIMER SOLICITANTE

DOMICILIO Sangroniz, 6:

LOCALIDAD SONDICA

PROVINCIA VIZCAYA

PAIS RESIDENCIA ESPAÑA

NACIONALIDAD ESPAÑA

TELEFONO

FAX

CORREO ELECTRONICO

CÓDIGO POSTAL 48150

CÓDIGO PAIS ES

CÓDIGO NACIÓN ES

(7) INVENTOR (ES):

APELLIDOS

NOMBRE

NACIONALIDAD

CÓDIGO PAÍS

Gómez Román

José Javier

ESPAÑOLA

ES

Saenz Jiménez

María Pilar

ESPAÑOLA

ES

Ochoa Garay

Jorge

ESPAÑOLA

ES

(8)

☐ EL SOLICITANTE ES EL INVENTOR

☒ EL SOLICITANTE NO ES EL INVENTOR O ÚNICO INVENTOR

(9) MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO:

☒ INVENC. LABORAL

☐ CONTRATO

☐ SUCESIÓN

(9) TÍTULO DE LA INVENCION

METODOS IN VITRO PARA LA DETECCION DE UN CARCINOMA, DETERMINACIÓN DE SU ESTADIO O SEVERIDAD Y PARA LA DETERMINACIÓN DE SU DESARROLLO.

(11) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA:

☐ SI

☒ NO

(12) EXPOSICIONES OFICIALES: LUGAR

FECHA

(13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:  
PAIS DE ORIGEN

CÓDIGO PAÍS

NÚMERO

FECHA

(14) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASAS PREVISTO EN EL ART. 162. LEY 11/86 DE PATENTES

☐

(15) AGENTE/REPRESENTANTE: NOMBRE Y DIRECCIÓN POSTAL COMPLETA. (SI AGENTE P.I., NOMBRE Y CÓDIGO) (RELLÉNSE, ÚNICAMENTE POR PROFESIONALES)

CARPINTERO LOPEZ, FRANCISCO, 403/0, ALCALA, 35, MADRID, MADRID, 28014, ESPAÑA

(16) RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN:

☒ DESCRIPCIÓN. Nº DE PÁGINAS: 26

☒ Nº DE REIVINDICACIONES: 5

☒ DIBUJOS. Nº DE PÁGINAS: 1

☐ LISTA DE SECUENCIAS Nº DE PÁGINAS: 0

☒ RESUMEN

☐ DOCUMENTO DE PRIORIDAD

☐ TRADUCCIÓN DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD

☒ DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN

☒ JUSTIFICANTE DEL PAGO DE TASAS DE SOLICITUD

☒ HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

☐ PRUEBAS DE LOS DIBUJOS

☐ CUESTIONARIO DE PROSPECCIÓN

☒ OTROS: DISKETE

FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE

FRANCISCO CARPINTERO LOPEZ

FIRMA DEL FUNCIONARIO

NOTIFICACIÓN DE PAGO DE LA TASA DE CONCESIÓN:

Se le notifica que esta solicitud se considerará retirada si no procede al pago de la tasa de concesión; para el pago de esta tasa dispone de tres meses a contar desde la publicación del anuncio de la concesión en el BOPI, más los diez días que establece el art. 81 del R.D. 2245/1986

ILMO. SR. DIRECTOR DE LA OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

Informacion@oepm.es

www.oepm.es

C/ PANAMÁ, 1 • 28071 MADRID

MOD. 3101 - 1 - EJEMPLAR PARA EL EXPEDIENTE

NO CUMPLIMENTAR LOS RECUADROS ENMARCADOS EN ROJO



MINISTERIO  
DE CIENCIA  
Y TECNOLOGÍA



Oficina Española  
de Patentes y Marcas

NÚMERO DE SOLICITUD  
**P200301518**

FECHA DE PRESENTACIÓN

3 JUN 20 11 50

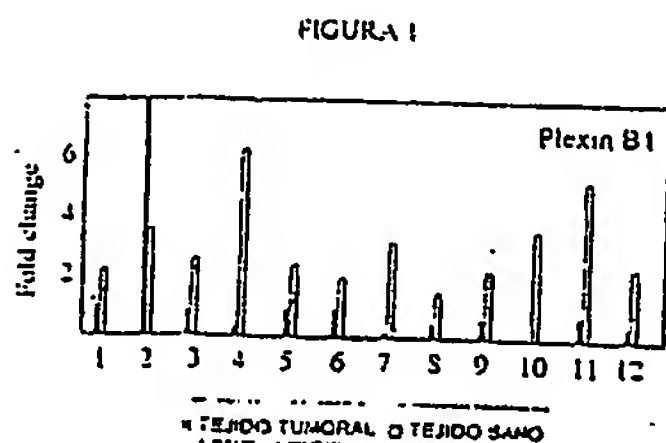
## RESUMEN Y GRÁFICO

### RESUMEN (Máx. 150 palabras)

MÉTODOS IN VITRO PARA LA DETECCIÓN DE UN CARCINOMA, DETERMINACIÓN DE SU ESTADIO O SEVERIDAD Y PARA LA DETERMINACIÓN DE SU DESARROLLO.

La presente invención se refiere a un método in vitro para detectar la presencia de carcinomas en un individuo, para determinar el estadio, la malignidad, o la severidad de dicho carcinoma en el individuo, o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un individuo que presente dicho carcinoma; a la búsqueda, identificación, desarrollo y evaluación de la eficacia de compuestos para terapia de dicho carcinoma con el fin de desarrollar nuevos medicamentos; así como a agentes que inducen la expresión y/o la actividad de la proteína Plexina-B1, o a agentes que inhiben los efectos de la represión de la expresión y/o actividad de la proteína Plexina-B1.

### GRÁFICO



(VER INFORMACIÓN)



MINISTERIO  
DE CIENCIA  
Y TECNOLOGÍA



Oficina Española  
de Patentes y Marcas

## SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION

(21) NÚMERO DE SOLICITUD  
**200301518**

(22) FECHA DE PRESENTACIÓN  
**30/06/2003**

(62) PATENTE DE LA QUE ES  
DIVISIONARIA

(31) NÚMERO

DATOS DE PRIORIDAD

(32) FECHA

(33) PAÍS

(71) SOLICITANTE (S)  
**MEDPLANT GENETICS, S.L.**

DOMICLIO Sangroniz, 6.  
SONDICA, VIZCAYA, 48150, ESPAÑA

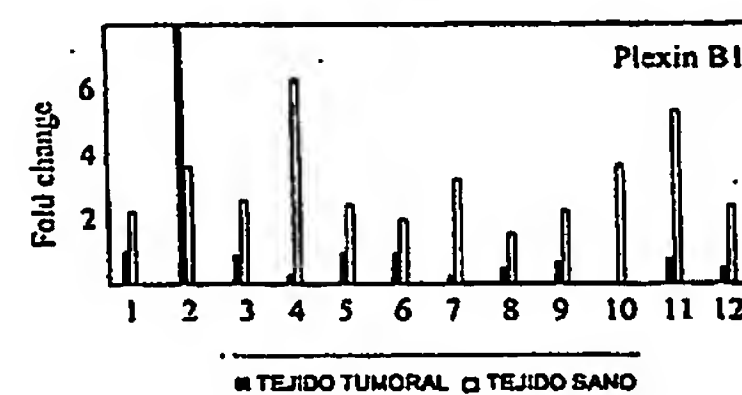
NACIONALIDAD ESPAÑA

(72) INVENTOR (ES) **José Javier Gómez Román, María Pilar Saenz Jiménez, Jorge Ochoa Garay, Jokin Del Amo Iribarren, Cristina Sanz Ibayondo, Corina Junquera Sánchez-Vallejo,**

(51) Int. Cl.

GRÁFICO (SÓLO PARA INTERPRETAR RESUMEN)

FIGURA 1



(54) TÍTULO DE LA INVENCION  
**METODOS IN VITRO PARA LA DETECCION DE UN CARCINOMA, DETERMINACIÓN DE SU ESTADIO O SEVERIDAD Y PARA LA DETERMINACIÓN DE SU DESARROLLO.**

(57) RESUMEN  
**METODOS IN VITRO PARA LA DETECCION DE UN CARCINOMA, DETERMINACIÓN DE SU ESTADIO O SEVERIDAD Y PARA LA DETERMINACIÓN DE SU DESARROLLO.**

La presente invención se refiere a un método in vitro para detectar la presencia de carcinomas en un individuo, para determinar el estadio, la malignidad, o la severidad de dicho carcinoma en el individuo, o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un individuo que presente dicho carcinoma; a la búsqueda, identificación, desarrollo y evaluación de la eficacia de compuestos para terapia de dicho carcinoma con el fin de desarrollar nuevos medicamentos; así como a agentes que inducen la expresión y/o la actividad de la proteína Plexina-B1, o a agentes que inhiben los efectos de la represión de la expresión y/o actividad de la proteína Plexina-B1.

**METODOS IN VITRO PARA LA DETECCION DE UN  
CARCINOMA, DETERMINACIÓN DE SU ESTADIO O SEVERIDAD  
Y PARA LA DETERMINACIÓN DE SU DESARROLLO.**

5

**CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a un método *in vitro* para detectar la presencia de carcinomas en un individuo, para determinar el estadio, la malignidad, o la severidad de dicho carcinoma en el individuo, o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un individuo que presente dicho carcinoma; a la búsqueda, identificación, desarrollo y evaluación de la eficacia de compuestos para terapia de dicho carcinoma con el fin de desarrollar nuevos medicamentos; así como a agentes que inducen la expresión y/o la actividad de la proteína Plexina-B1, o a agentes que inhiben los efectos de la represión de la expresión y/o actividad de la proteína Plexina-B1.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

A pesar de todos los avances que se han producido en los últimos años, el cáncer es todavía una de las principales causas de muerte en todo el mundo. Más de 5 millones de nuevos casos de cáncer se diagnostican cada año en el mundo y más de 3.5 millones de muertes están causadas por los distintos tipos de cáncer, según datos de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer, GLOBOCAN, del año 2000.

Las neoplasias renales son tumores frecuentes en las sociedades occidentales; representan el 2% de todos los casos de cáncer. Según datos de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer, GLOBOCAN, del año 2000, cada año se diagnostican más de 90.000 nuevos casos en Europa, 9.000 en Japón y 30.000 en América del Norte; más de 39.000, 4.000 y 12.000 muertes son causadas por el carcinoma renal cada año en Europa, Japón y América del Norte,



respectivamente; y la mortalidad a escala mundial causada por el carcinoma renal supera los 100.000 casos anuales.

Avances en el conocimiento de la Genética del cáncer han permitido la clasificación de distintos tipos de tumores renales. El subtipo más común es el carcinoma convencional de células renales, que es diferente de los subtipos papilar, cromóforo o ductal colector. El oncocitoma renal es una neoplasia benigna, indistinguible en ocasiones del carcinoma renal, que es una neoplasia maligna. Estudios previos han demostrado que todos estos subtipos histológicos son distintos genética y biológicamente, y que tanto su morfología como comportamiento están determinados por factor moleculares distintivos (Kovacs G., et al., J. Pathol., 1997, 183:131-133).

En la actualidad, los sistemas de diagnóstico del cáncer renal están basados en la identificación de síntomas clínicos y en técnicas radiológicas. Los síntomas más comunes son hematuria (en el 50-60 % de los pacientes), dolor abdominal (en el 40 % de los pacientes) y una masa palpable en el flanco del abdomen (en el 30-40 % de los pacientes) (Ritchie A.W.S. and Chisholm G.D., Semin. Oncol., 1983, 10:390-400). La combinación simultánea de estos síntomas ("triada clásica") se produce en menos del 10 % de los pacientes. Tumores pequeños, localizados, raramente producen síntomas, retrasando el diagnóstico a estadios avanzados. El 25 % de los tumores se diagnostican por tomografía computerizada y ultrasonografía (Porena M., et al., J. Clin. Ultrasound, 1992, 20:395-400; Konnack J.W. and Grossman H.B., J. Urol., 1985, 134:1094-1096; Thompson I.M. and Peek M., J. Urol., 1988, 140:487-490); los tumores diagnosticados con estas técnicas son normalmente más pequeños que los que producen síntomas y son más fácilmente resecables para conseguir la curación (Konnack J.W. and Grossman H.B., J. Urol., 1985, 134:1094-1096; Thompson I.M. and Peek M., J. Urol., 1988, 140:487-490; Smith S.J., et al., Radiology, 1989, 170:699-703).

La alteración de los niveles de expresión génica está estrechamente relacionada con el crecimiento celular descontrolado y con procesos de diferenciación, hechos comunes a todos los tipos de cáncer. Los niveles de expresión de los denominados "genes supresores de tumores", que actúan para evitar el crecimiento celular maligno, están reprimidos en las células tumorales; y

los niveles de expresión de los denominados “oncogenes”, que actúan para inducir el crecimiento maligno, están aumentados en las células tumorales.

Se han asociado muchos genes al desarrollado al desarrollo del cáncer renal, como el gen de von Hippel-Lindau (Seizinger B.R., et al., Nature, 1988, 332:268-269) , el gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (Ishikawa J., et al., Int. J. Cancer, 1990, 45:1018-1021), el gen de transformación del factor de crecimiento alfa (Lager D.J., et al., Mod. Pathol., 1994, 7:544), el oncogen c-myc (Yao M., et al., Cancer Res., 1988, 48:6753-6757), genes del metabolismo retinoide (Guo X., et al., Cancer Res., 2001, 61:2774-2781), o genes de factores de adhesión celular (Kuroiwa, K., et al., J. Surg. Oncol., 2001, 77:123-131). Sin embargo, muchos de los genes implicados en el inicio y la progresión de los tumores renales son todavía desconocidos.

Actualmente no existe ningún método no invasivo *in vitro* que detecte, con niveles aceptables de sensibilidad y especificidad, los tumores renales; un método no invasivo con alta sensibilidad y especificidad permitiría la realización rutinaria de análisis clínicos para la detección de estos tumores. La identificación de genes expresados diferencialmente en carcinomas renales, podría permitir la identificación de marcadores biológicos, que podrían tener un alto valor para el diagnóstico *in vitro*, el pronóstico *in vitro* y el tratamiento de esta enfermedad (Boer J.M., et al., Genome Res., 2001, 11:1861-1870). La detección de cambios en el nivel de expresión génica o en la concentración de las proteínas codificadas, en fluidos corporales, podría ser la base de métodos no invasivos de diagnóstico *in vitro* del cáncer renal.

Una vez que al paciente se le ha diagnosticado un cáncer renal, la resección quirúrgica es el tratamiento de elección. La nefrectomía radical, que incluye resección del riñón, grasa perirenal y la glándula adrenal ipsilateral, ha sido generalmente realizada desde los años 60 (Robson C.J., et al., J. Urol, 1969, 101:297-301). La cirugía “nephron-sparing” se ha utilizado para tratar tumores pequeños localizados (Herr H.W., Cancer, 1994, 73:160-162). El parámetro más importante para predecir la supervivencia es la extensión anatómica del tumor. Los pacientes con tumores pequeños, localizados, que son resecados completamente, tienen unos índices de supervivencia mayores que aquellos con afectación nodal o

con metástasis distal. El 20-30 % de los pacientes con tumores localizados se curan tras la nefrectomía radical; menos de un 5% sufren recidivas locales y un 50-60% de los pacientes desarrollan metástasis a distancia (Rabinovitch R.A., et al., J. Clin. Oncol., 1994, 12:206-212; Sandock, D.S., et al., J. Urol, 1995, 154:28-31). Una vez que la metástasis se desarrolla, el pronóstico de supervivencia a largo plazo empeora significativamente; actualmente el 30% de los pacientes que se diagnostican ya se encuentran en un estadio IV, es decir, han desarrollado metástasis a distancia.

El tratamiento del carcinoma renal es extremadamente difícil por su capacidad de extenderse sin producir síntomas, por su inherente resistencia a la quimioterapia sistémica convencional y por la incapacidad de la radioterapia para reducir los niveles de recaída tras la nefrectomía, incluso en pacientes con afectación nodal o tumores no resecados completamente (Kjaer M., et al., Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 1987, 13:665-672). Casi el 50 % de los pacientes, y el 90-95 % de los pacientes con metástasis a distancia, mueren durante los 5 años posteriores al diagnóstico. Frente a esta realidad, estudios de Genética Molecular están facilitando el conocimiento de la patogénesis de esta enfermedad y pueden proporcionar nuevas dianas contra las que desarrollar nuevos agentes terapéuticos que sean más eficaces que los disponibles en la actualidad.

La familia de proteínas denominadas Plexinas esta compuesta por varios proteínas con dominios transmembrana citoplasmática celular; las Plexinas actúan como receptores de las proteínas de la familia de las Semaforinas, aunque también se han encontrado expresadas en tejidos extraneuronales con otras funciones moleculares. La Plexina-B1 actúa como receptor de la Semaforina III, que es una proteína que causa el colapso del crecimiento conal de las neuronas y la repulsión química de los axones (Driessens M.H., Olivo C., Nagata K., Inagaki, M., Collard J.G., FEBS lett., 2002, 529:168-172). A día de hoy, no se ha demostrado que las Plexinas jueguen un papel en el proceso de carcinogénesis; sin embargo se ha demostrado que existe un patrón complejo y dinámico de interacción entre Plexinas y pequeñas proteínas rho guanosa trifosfatasa (Castellani V., et al., Curr. Opin. Neurobiol., 2002, 12:532). Estas Rho-GTPasas tienen una función en el reordenamiento del citoesqueleto y están implicadas en procesos de adhesión y



migración celular; de hecho, la activación de la proteína Rac, uno de los miembros de esta familia, se ha asociado con procesos de inducción de la migración celular y el desarrollo de un fenotipo de invasión tumoral (Keely, et al., 1997. Nature 390, 632-637; Sander, et al., J. Cell Biol., 1998, 143:1385-1398). Por otro lado la

5 quinasas activada por la proteína p21 (PAK) es el factor activador de Rac y compite con la Plexina-B1 por unirse a Rac; esta interacción es bidireccional, ya que la interacción Plexina-B1 – Rac inhibe la activación de PAK (Vikis H.G., Li W., and Guan K.L. Genes Dev., 2002, 16:836-845; Vikis H.G., Li W., and Guan K.L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002, 99:12085-12090). Se ha descrito también, utilizando

10 DNA-chips, que el gen *plexina-B1* era uno de los 213 genes que presentaban una expresión reducida en muestras de carcinomas de células renales, al compararlas con muestras de riñón sano (Gieseg M.A., Cody T., Man M.Z., Madore S.J., Rubin M.A., and Kalfjian E.P., BMC Bioinformatics, 2002, 3:26); pero no demostraban los autores de este trabajo, que los niveles diferenciales de expresión génica de la

15 Plexina-B1 se mantuviesen al analizar las muestras por métodos más sensibles, específicos y fiables que los DNA-chips, como por ejemplo RT-PCR cuantitativa; ni demostraban que los niveles diferenciales de expresión génica se tradujesen en niveles diferenciales de expresión proteica.

20 En concordancia con esta hipotética función de la Plexina-B1, los autores de la presente invención han descubierto, tras laboriosa investigación y empleando diferentes técnicas (DNA-chips y PCR cuantitativa para medir los niveles de expresión génica y Western-blot para medir los niveles de expresión proteica), que sorprendentemente la expresión del gen *plexina-B1* se ve reducida en carcinomas de

25 riñón, siendo la reducción proporcional a la malignidad y a la invasividad. Más sorprendentemente, los autores de la presente invención han descubierto que también la concentración de la proteína Plexina-B1 se ve disminuida en carcinomas de riñón.

30 La presente invención proporciona por tanto un método *in vitro* para detectar la presencia de un carcinoma en un individuo, para determinar el estadio o la severidad de dicho carcinoma en el individuo, o para monitorizar el efecto de la

terapia administrada a un individuo que presente dicho carcinoma, basado en la detección y/o cuantificación de la proteína Plexina-B1, del mRNA del gen *plexina-B1* o el correspondiente cDNA en una muestra de dicho individuo.

5

## OBJETO DE LA INVENCION

La presente invención tiene como objeto principal proporcionar un método para detectar la presencia de un carcinoma en un individuo, para determinar el estadio o la severidad de dicho carcinoma en el individuo, o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un individuo que presente dicho carcinoma, basado en la detección y/o cuantificación de la proteína Plexina-B1, del mRNA del gen *plexina-B1* o el correspondiente cDNA en una muestra de dicho individuo. El carcinoma a detectar es preferiblemente un carcinoma de riñón.

Otro objeto de la presente invención es un método *in vitro* para buscar, identificar, desarrollar y evaluar la eficacia de compuestos para la terapia del cáncer; preferiblemente del cáncer de riñón.

Un objeto adicional de la invención reside en el uso de secuencias derivadas del gen *plexina-B1* en métodos de búsqueda, identificación, desarrollo y evaluación de la eficacia de compuestos para terapia del cáncer; en particular para terapia del cáncer de riñón.

Otro objeto de la presente invención consiste en proporcionar agentes caracterizados porque inducen la expresión y/o la actividad de la proteína Plexina-B1, o porque inhiben los efectos carcinogénicos de la represión de la expresión de la proteína Plexina-B1, para el tratamiento del cáncer; en particular del cáncer de riñón.

25

Por último, es también objeto de la invención una composición farmacéutica que comprenda uno o varios agentes terapéuticos junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable, para el tratamiento del cáncer; en particular del cáncer de riñón.

30

## DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

*Figura 1: Niveles diferenciales de expresión del gen plexina-B1, por RT-PCR cuantitativa en tiempo real, en muestras procedentes de biopsias de riñón de individuos afectados por distintos tipos de carcinomas renales. Las barras representan el nivel de expresión del gen plexina-B1 frente al nivel de expresión del gen gadph (gen de referencia) en cada una de las muestras tumorales y no tumorales.*

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Para facilitar la comprensión de la presente solicitud de patente, exponemos a continuación el significado de algunos términos y expresiones en el contexto de la invención:

Los términos “sujeto” o “individuo” se refieren a miembros de especies de animales mamíferos, e incluye, pero no se limita, a animales domésticos, primates y humanos; el sujeto es preferiblemente un ser humano, masculino o femenino, de cualquier edad o raza.

El término “cáncer o carcinoma” se refiere a la enfermedad que se caracteriza por una proliferación descontrolada de células anormales capaces de invadir tejidos adyacentes y diseminarse a órganos lejanos.

El término “cáncer de riñón” refiere a cualquier desorden proliferativo maligno de células del riñón.

El término “tumor” se refiere a cualquier masa anormal de tejido producto de un proceso neoplásico, benigno (no canceroso) o maligno (canceroso).

El término “gen” se refiere a una cadena molecular de desoxirribonucleótidos, que codifica una proteína.

El término “DNA” se refiere al ácido desoxirribonucleico. Una secuencia de DNA es una secuencia de desoxirribonucleótidos.

El término “cDNA” se refiere a una secuencia de nucleótidos, complementaria de una secuencia de mRNA.

El término “RNA” se refiere al ácido ribonucleico. Una secuencia de RNA es una secuencia de ribonucleótidos.

El término “mRNA” se refiere al ácido ribonucleico mensajero, que es la fracción del RNA total que se traduce a proteínas.

La frase "mRNA transcrito de" se refiere a la transcripción del gen (DNA) en mRNA, como primer paso para que el gen se exprese y traduzca a proteína.

El término "secuencia de nucleótidos" o "secuencia nucleotídica" se refiere indistintamente a una secuencia de ribonucleótidos (RNA) o de desoxirribonucleótidos (DNA).

El término "proteína" se refiere a una cadena molecular de aminoácidos, con una actividad biológica.

El gen "plexina-B1" corresponde al gen denominado "plexin-B1" en inglés y presenta el número de código de GeneBank ACCB007867.

Los términos "péptido" y "polipéptido" se refieren a un fragmento proteico. Los términos "proteína" y "péptido", se usan indistintamente.

La frase "expresión reducida" significa que los niveles medidos del gen o de la proteína en pacientes de cáncer, son inferiores a los niveles medidos en una población control de sujetos sin historial de cáncer.

El término "sensibilidad" se refiere a la detección de falsos negativos (diagnóstico negativo de cáncer, cuando el paciente está afectado de cáncer); una sensibilidad del 100% significa que no hay falsos negativos.

El término "especificidad" se refiere a la detección de falsos positivos (diagnóstico positivo de cáncer, cuando el paciente no está afectado de cáncer); una especificidad del 100% significa que no hay falsos positivos.

El término "anticuerpo" se refiere a una glucoproteína que exhibe una actividad de unión específica por una proteína particular, a la que se denomina "antígeno". El término "anticuerpo" comprende anticuerpos monoclonales, o anticuerpos policlonales, intactos, o fragmentos de ellos; e incluye anticuerpos humanos, humanizados y de origen no humano. Los "anticuerpos monoclonales" son poblaciones homogéneas de anticuerpos, altamente específicos, que están dirigidas contra un único sitio o "determinante" antigénico. Los "anticuerpos policlonales" incluyen poblaciones heterogéneas de anticuerpos, que están dirigidos contra diferentes determinantes antigénicos.

El término "epítipo", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a un determinante antigénico de una proteína, que es la secuencia de aminoácidos de la proteína que un anticuerpo específico reconoce.

El término "fase sólida", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a una matriz no acuosa a la que se puede unir el anticuerpo. Ejemplos de materiales para fase sólida incluyen vidrio, polisacáridos, por ejemplo agarosa, poliacrilamida, poliestireno, alcohol polivinílico y siliconas. Ejemplos de formas de fase sólida son el pocillo de una placa de ensayo o una columna de purificación.

El término "oligonucleótido cebador", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a una secuencia nucleotídica, que es complementaria de una secuencia nucleotídica del gen *plexina-B1*. Cada cebador hibrida con su secuencia nucleotídica diana y actúa como un sitio de inicio para la polimerización del DNA.

El término "sonda", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a una secuencia nucleotídica complementaria de una secuencia nucleotídica derivada del gen *plexina-B1*, que se puede utilizar para detectar esa secuencia nucleotídica derivada del gen *plexina-B1*.

El término "diana terapéutica" se refiere a secuencias nucleotídicas o peptídicas, contra las que se puede diseñar y aplicar clínicamente un fármaco o compuesto terapéutico.

El término "agonista" se refiere a cualquier molécula que mimetice la actividad biológica de la molécula agonizada. Ejemplos de moléculas agonistas incluyen, entre otros, proteínas, péptidos, variaciones de secuencia de péptidos naturales y pequeñas moléculas orgánicas (de peso molecular inferior a 500 daltons).

El término "vector de expresión recombinante" se refiere a un replicón al que está ligada otra secuencia de nucleótidos, para que esta otra secuencia pueda ser transportada, introducida y expresada en el interior de las células.

El término "replicón" se refiere a una secuencia de nucleótidos que es capaz de autoreplicarse en el interior de las células.

La presente invención se basa en el descubrimiento de que tanto la expresión génica del gen *plexina-B1*, como la concentración de la proteína Plexina-B1 se ven reprimidas con el desarrollo de un cáncer; especialmente en los cánceres de riñón.



En este sentido, la presente invención proporciona, en primer lugar, un método *in vitro* para detectar la presencia de un carcinoma en un individuo, para determinar el estadio o la severidad de dicho carcinoma en el individuo, o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un individuo que presente dicho carcinoma, que comprende:

- a) la detección y/o cuantificación de la proteína Plexina-B1, del mRNA del gen *plexina-B1* o el correspondiente cDNA en una muestra de dicho individuo, y
- b) la comparación de la cantidad de proteína Plexina-B1, de la cantidad de mRNA del gen *plexina-B1* o de la cantidad del correspondiente cDNA detectada en una muestra de un individuo; con la cantidad de proteína Plexina-B1, con la cantidad del mRNA del gen *plexina B1* o con la cantidad del correspondiente cDNA detectada en las muestras de individuos control o en muestras anteriores del mismo individuo o con los valores normales de referencia.

El método proporcionado por la presente invención es de alta sensibilidad y especificidad, y se basa en que sujetos o individuos diagnosticados de cáncer, en particular de cáncer de riñón, presentan niveles bajos de mRNA transcrito del gen *plexina-B1*, niveles reducidos de expresión del gen *plexina-B1*, o concentraciones disminuidas de la proteína codificada por el gen *plexina-B1* (proteína Plexina-B1), en comparación con los correspondientes niveles en muestras procedentes de sujetos sin historial clínico de cáncer, como por ejemplo cáncer de riñón.

El presente método comprende una etapa de obtención de la muestra del individuo. Se puede trabajar con distintas muestras fluidas como, por ejemplo: orina, sangre, plasma, suero, líquido pleural, líquido ascítico, líquido sinovial, bilis, semen o líquido cefalorraquídeo. La muestra también puede ser un tejido, como por ejemplo tejido de riñón, que se puede obtener por cualquier método convencional.

Las muestras pueden ser obtenidas de sujetos previamente diagnosticados, o no diagnosticados, de cáncer, como por ejemplo cáncer de riñón; o también de un

sujeto en tratamiento, o que ha sido tratado previamente contra el cáncer, especialmente contra el cáncer de riñón.

El presente método comprende además una etapa de extracción de la muestra, ya sea para obtener el extracto de proteínas de ésta, o bien para obtener el extracto de RNA total. Uno de estos dos extractos representa el material de trabajo para la siguiente fase. Los protocolos de extracción de la proteína total o del RNA total son bien conocidos por el experto en la materia (Chomczynski P. et al., Anal. Biochem., 1987, 162: 156; Chomczynski P., Biotechniques, 1993, 15: 532).

Cualquier ensayo convencional se puede utilizar en el marco de la invención para detectar cáncer, especialmente el cáncer de riñón, siempre que midan *in vitro* los niveles de mRNA transcrito del gen *plexina-B1* o su cDNA complementario, o la concentración de proteína Plexina-B1, en muestras recogidas de los individuos a analizar y de individuos control.

En el caso de que lo que se pretenda detectar sea la proteína, concretamente la proteína Plexina-B1, el método de la invención comprende una primera etapa de puesta en contacto del extracto de proteínas de la muestra con una composición de uno o más anticuerpos específicos contra uno o más epítomos de la proteína Plexina-B1, y una segunda etapa de cuantificación de los complejos formados por anticuerpos y la proteína Plexina-B1.

Existe una amplia variedad de ensayos inmunológicos disponibles para detectar y cuantificar la formación de complejos específicos antígeno-anticuerpo; numerosos ensayos de unión de proteínas, competitivos y no competitivos, han sido previamente descritos, y un gran número de estos ensayos está disponible comercialmente.

Así, la proteína Plexina-B1 se puede cuantificar con anticuerpos como, por ejemplo: anticuerpos monoclonales, policlonales, intactos o fragmentos recombinantes de ellos, combibodies y fragmentos Fab o scFv de anticuerpos,

específicos contra la proteína Plexina-B1; siendo estos anticuerpos humanos, humanizados o de origen no humano. Existen anticuerpos que se unen específicamente a la proteína Plexina-B1, que están disponibles comercialmente. Los anticuerpos que se emplean en estos ensayos pueden estar marcados o no; los anticuerpos no marcados se pueden utilizar en ensayos de aglutinación; los anticuerpos marcados se pueden utilizar en una amplia variedad de ensayos. Las moléculas marcadoras que se pueden utilizar para marcar los anticuerpos incluyen radionucleótidos, enzimas, fluoróforos, reactivos quimioluminiscentes, sustratos enzimáticos o cofactores, inhibidores enzimáticos, partículas, colorantes y derivados.

Existe una amplia variedad de ensayos bien conocidos, que se pueden utilizar en la presente invención, que utilizan anticuerpos no marcados (anticuerpo primario) y anticuerpos marcados (anticuerpo secundario); entre estas técnicas se incluyen el Western-blot o transferencia Western, ELISA (Enzyme-Linked immunosorbent assay o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima), RIA (Radioinmunoassay o Radioinmunoensayo), EIA competitivo (Competitive enzyme immunoassay o Inmunoensayo enzimático competitivo), DAS-ELISA (Double antibody sandwich-ELISA o ensayo ELISA sándwich con doble anticuerpo), técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, técnicas basadas en el empleo de biochips o microarrays de proteínas que incluyan anticuerpos específicos o ensayos basados en precipitación coloidal en formatos tales como dipsticks. Otras maneras para detectar y cuantificar la proteína Plexina-B1, incluyen técnicas de cromatografía de afinidad, ensayos de unión a ligando o ensayos de unión a lectina.

El inmunoensayo preferido en el método de la invención es un ensayo ELISA sándwich con doble anticuerpo. En este inmunoensayo se puede utilizar cualquier anticuerpo o combinación de anticuerpos, específicos contra uno o más epítopos de la proteína Plexina-B1. Como ejemplo de uno de los muchos posibles formatos de este ensayo, un anticuerpo, monoclonal o policlonal, o un fragmento de este anticuerpo, o una combinación de anticuerpos, que recubren una fase sólida, se ponen en contacto con la muestra a analizar, y se incuban durante un tiempo y en condiciones apropiados para formar los complejos antígeno-anticuerpo. Después de un lavado en condiciones apropiadas para eliminar los complejos no específicos, se

incuba con los complejos antígeno-anticuerpo, en condiciones y tiempo apropiados, un reactivo indicador, que comprende un anticuerpo monoclonal o policlonal, o un fragmento de este anticuerpo, o una combinación de estos anticuerpos, unidos a un compuesto generador de una señal. La presencia de la proteína Plexina-B1 en la muestra a analizar, se detecta y cuantifica, en caso de que exista, midiendo la señal generada. La cantidad de proteína Plexina-B1 presente en la muestra analizar es proporcional a esa señal.

En el caso de que se pretenda detectar el mRNA o el cDNA correspondiente

al gen *plexina-B1*, y no la proteína, el método de la invención presenta etapas diferentes. Así, una vez obtenida la muestra y extraído el RNA total, el método de la invención, la detección del mRNA o del correspondiente cDNA del gen *plexina-B1*, comprende una primera etapa de amplificación del extracto de RNA total o del correspondiente cDNA sintetizado por retrotranscripción a partir del mRNA, y una segunda etapa de cuantificación del producto de la amplificación del mRNA o del cDNA del gen *plexina-B1*.

Un ejemplo de amplificación del mRNA, consiste en retrotranscribir el mRNA en cDNA (RT), seguido de la Reacción en Cadena de la polimerasa (PCR), usando oligonucleótidos cebadores, siendo las secuencias de los cebadores utilizados 5'ACAGTGTGACAGGCAAGGCC-3' y 5'-CACAGCCAATAGTGCATTCAAGG-3'; la PCR es una técnica de amplificación de una determinada secuencia nucleotídica (diana) contenida en una mezcla de secuencias nucleotídicas. En la PCR, se utiliza un exceso de una pareja de oligonucleótidos cebadores, que hibridan con las hebras complementarias de la secuencia nucleotídica diana. A continuación, una enzima con actividad polimerasa (DNA Taq Polimerasa) extiende cada cebador, utilizando como molde la secuencia nucleotídica diana. Los productos de la extensión se convierten entonces en secuencias dianas, tras la disociación de la hebra diana original. Nuevas moléculas de cebador hibridan y la polimerasa las extiende; el ciclo se repite para aumentar exponencialmente el número de secuencias diana. Esta técnica está descrita en las patentes US 4683195 y US 4683202. Se han descrito previamente muchos métodos

para detectar y cuantificar los productos de la amplificación por PCR, de los que cualquiera puede ser usado en esta invención. En un método preferido de la invención, el producto amplificado se detecta por electroforesis en gel de agarosa, de la manera siguiente: cinco microlitros del producto de la amplificación se someten a una separación por electroforesis en un gel de agarosa a una concentración del 2%, en un tampón TBE 0,5x a 100 vdc, durante una hora. Tras la electroforesis, el gel se tiñe con bromuro de etidio y el producto de la amplificación se visualiza al iluminar el gel con luz ultravioleta (uv); como alternativa a la tinción, y realización preferida, se puede transferir el producto amplificado a una membrana de nailon por técnicas de Southern blotting o transferencia Southern, para ser detectado con una sonda específica del cDNA del gen *plexina-B1*, convenientemente marcada.

En otro ejemplo la detección del mRNA se realiza transfiriendo el mRNA a una membrana de nailon, mediante técnicas de transferencia como por ejemplo Northern-blot o transferencia Northern, y detectándolo con sondas específicas del mRNA o del correspondiente cDNA del gen *plexina-B1*.

En una realización particular la amplificación y cuantificación del mRNA correspondiente al gen *plexina-B1* se realiza a la vez mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real (Q-PCR).

El paso final del método de la invención consiste en comparar la cantidad de proteína Plexina-B1, la del mRNA del gen *plexina-B1* o la del correspondiente cDNA detectada en una muestra de un individuo; con la cantidad de proteína Plexina-B1, la del mRNA del gen *plexina-B1* o la del correspondiente cDNA detectada en las muestras de sujetos control o en muestras anteriores del mismo individuo, o con los valores normales de referencia.

La invención también proporciona un método *in vitro* para identificar y evaluar la eficacia de agentes para terapia del cáncer, preferiblemente para el cáncer de riñón, que comprende:



- a) poner en contacto un cultivo de células tumorales, preferiblemente de riñón, con el agente candidato, en las condiciones y durante el tiempo apropiados para permitir que interaccionen,
- b) detectar y cuantificar los niveles de expresión del gen *plexina-B1* o la proteína Plexina-B1, y
- c) comparar dichos niveles de expresión con los de cultivos control de células tumorales sin tratar con el compuesto candidato.

10 La cuantificación de los niveles de expresión del gen *plexina-B1* o la proteína Plexina-B1 se realizan de modo semejante a como se indica en el método de la invención para detectar *in vitro* la presencia del cáncer de de riñón en un individuo.

15 Cuando un agente aumenta los niveles de expresión del gen *plexina-B1* o revierte los efectos de la expresión reducida de dicho gen, preferiblemente disminuyendo los niveles de proliferación celular, este agente se convierte en candidato para la terapia del cáncer y, especialmente del carcinoma de riñón.

20 Otro aspecto de la invención se refiere al uso de secuencias nucleotídicas o peptídicas derivadas del gen *plexina-B1* para detectar la presencia de un cáncer, especialmente de un cáncer de riñón en un individuo, para determinar el estadio o la severidad de dicho carcinoma en el individuo, o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un individuo que presente dicho carcinoma.

25

En otro aspecto de la invención se hace referencia a agentes caracterizados porque inducen la expresión y/o la actividad de la proteína Plexina-B1. Estos agentes, que se pueden identificar y evaluar según la presente invención, pueden ser seleccionados del grupo formado por:

- 30 a) vectores de expresión recombinantes que expresan la proteína Plexina-B1. El vector puede ser introducido *in vivo* en las células del individuo diagnosticado de cáncer; el vector de expresión también puede ser introducido en las células *ex vivo*,

rindiendo células transformadas que son posteriormente introducidas en el individuo. Ejemplos de vectores de expresión recombinantes son virus quiméricos; ejemplos de vectores virales útiles para terapia génica incluyen aquellos vectores derivados de adenovirus, virus herpes, vaccinia, o cualquier virus cuyo material genético sea RNA, como los retrovirus de aves o de murínidos. En estos vectores, el gen *plexina-B1* puede estar unido a un promotor de expresión génica específico del tejido afectado por el cáncer, por ejemplo riñón, de manera que se evite la expresión del vector en otros tejidos donde no es necesaria. Otros ejemplos de sistemas de vehiculización del gen *plexina-B1* al interior de las células tumorales son los sistemas de dispersión coloidal; ejemplos de sistemas de dispersión coloidal incluyen complejos macromoleculares, nanocápsulas, microsferas, perlas y sistemas lipídicos como emulsiones aceite-en-agua, micelios, micelios mixtos y liposomas.

b) agentes citotóxicos, tales como toxinas, moléculas con átomos radiactivos, o agentes quimio-terapéuticos, entre los que se incluyen, sin limitación, pequeñas moléculas orgánicas e inorgánicas, péptidos, fosfopéptidos, moléculas antisentido, ribozimas, moléculas de triple hélice, etc., que inhiben los efectos carcinogénicos de la represión de la expresión y/o de la actividad de la proteína Plexina-B1, y

c) compuestos agonistas de la proteína Plexina-B1, que inducen, mimetizan o reemplazan una o más de las funciones de la proteína Plexina-B1.

Otro objeto de la invención está constituido por el empleo de los agentes caracterizados porque inducen la expresión y/o la actividad de la proteína Plexina-B1, así como de la misma proteína Plexina-B1, en el tratamiento del cáncer, especialmente en el tratamiento del cáncer de riñón.

Constituye también un objeto de la presente invención una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o varios agentes de los mencionados anteriormente, o de la misma proteína Plexina-B1, junto con uno o más excipientes y/o sustancias transportadoras. Además dicha composición puede contener cualquier otro ingrediente activo que induzca, mimetice o reemplace una o más de las funciones de la proteína Plexina-B1.

Los excipientes, sustancias transportadoras y sustancias auxiliares tienen que ser farmacéuticamente y farmacológicamente tolerables, de modo que puedan ser combinados con otros componentes de la formulación o preparación y no ejerzan efectos adversos en el organismo tratado. Las composiciones farmacéuticas o formulaciones incluyen aquellas que son adecuadas para la administración oral o parenteral (incluyendo subcutánea, intradérmica, intramuscular e intravenosa), aunque la mejor vía de administración depende del estado del paciente. Las formulaciones pueden ser en forma de dosis sencillas. Las formulaciones se preparan de acuerdo con métodos conocidos en el campo de la farmacología. Las cantidades de sustancias activas para administrarse pueden variar en función de las particularidades de la terapia.

Por último, constituye también un objeto de esta invención el uso de secuencias nucleotídicas o peptídicas derivadas del gen *plexina-B1*, como dianas o herramientas para el desarrollo de fármacos para tratar el cáncer en un individuo, especialmente el cáncer de riñón.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención:

**Ejemplo 1.- Análisis diferencial de expresión del gen *plexina-B1* en muestras de tejido de Riñón, utilizando los microarrays *Human Genome U95 DNA arrays*.**

#### 1.1. Materiales y métodos

**Microarrays.** Se utilizaron los microarrays *GeneChip Test 3* (Affymetrix, Santa Clara), que permiten testar la calidad del RNA, previamente al análisis de expresión con el array *GeneChip Human Genome U95A* (Affymetrix, Santa Clara), que representa 12.000 secuencias completas de genes anotados; el gen *plexina-B1* (*plexin B1*) está representado en el microarray por el set de sondas 33783\_at de Affymetrix, que son oligonucleótidos *sentido* de 25 nucleótidos de longitud, diseñados en base a la secuencia Hs.200480 de Unigene, o AB007867 de GeneBank (Tabla 1).

**Tabla 1. Descripción de las sondas correspondientes al set de sondas 33783\_at**

Orden Consecutivo De las sondas	Zona de la secuencia de referencia interrogada	Secuencia de la sonda(5'3')
1	6720	TTCAGCCTGGCCTGGGCAGCCCTGG
2	6757	GAGGCCACCTTCTTAGGTGCCTGTA
3	6775	GCCTGTAGTGACTGACAAGCAGAGT
4	6777	CTGTAGTGACTGACAAGCAGAGTTA
5	6863	AGACCCGGGGCCTCAAGGCTCATGG
6	6871	GGCCTCAAGGCTCATGGGGTAGTAC
7	6882	TCATGGGGTAGTACCCAGCCTGCTC
8	6916	AGCGACCCTGTGACACCGGTCTGCA
9	6918	CGACCCTGTGACACCGGTCTGCAGG
10	7021	CTGGCCTTGGCCACACTGGGATTCTG
11	7024	GCCTTGGCCACACTGGGATTCTGGAG
12	7055	GAGGAGAGCCCCATGCTTCCTGTCT
13	7057	GGAGAGCCCCATGCTTCCTGTCTGC
14	7210	ACAGGGCTGCCCTGCCTCATAGGTA
15	7222	TGCCTCATAGGTAGCCATGGTGAGG
16	7274	AGAGTGGTGACTCCATTGACCCAGC

5

10

15

**Muestras.** Las muestras de riñón estudiadas procedían de biopsias, obtenidas por resección quirúrgica, de 12 individuos afectados de oncocitoma renal (n=1), carcinoma renal convencional (n=8), carcinoma renal cromóforo (n=1) o carcinoma renal de células papilares (n=2). De cada individuo, se recolectó tejido neoplásico y, como control negativo, tejido no neoplásico. Todas las muestras fueron clasificadas histológicamente en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, el mismo hospital donde las muestras habían sido recogidas, siguiendo los preceptos de la Declaración de Helsinki. Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido inmediatamente tras su extracción y se mantuvieron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su análisis.

**Tabla 2. Datos clinicopatológicos de los neoplasmas renales analizados.**

Caso	Edad	Género	Diagnóstico histológico	Estadio	Evolución
1	58	Hombre	CR Convencional	II	V&S (28 meses)
2	80	Hombre	CR Convencional	II	V&S (16 meses)
3	78	Hombre	CR Convencional	II	V&S (20 meses)
4	38	Hombre	CR Convencional	II	V&S (24 meses)
5	68	Hombre	CR Convencional	II	V&S (24 meses)
6	76	Mujer	CR Convencional	II	V&S (22 meses)
7	51	Hombre	CR Convencional	III	MDE (15 meses)
8	45	Hombre	CR Convencional	III	MDE (11 meses)
9	57	Hombre	CR Cromóforo	II	V&S (25 meses)
10	55	Hombre	CR Papilar (bajo grado)	II	V&S (24 meses)
11	69	Hombre	CR Papilar (alto grado)	III	V&S (18 meses)
12	79	Hombre	Oncocitoma renal	II	V&S (26 meses)

CR: Carcinoma renal

V&S (n meses): Vivo y Sano, n meses después de diagnóstico.

5 MDE (n meses): Muerto debido a la enfermedad, n meses después de diagnóstico.

#### **Análisis *GeneChip* de expresión génica**

10 El análisis se llevó a cabo con RNA total procedente de 1 muestra de tejido neoplásico de riñón de 1 individuos afectado de oncocitoma renal (Muestra #12), con mezclas equimolares (pools) de RNAs totales procedentes de un conjunto de 8 muestras de tejido neoplásico de riñón de 8 individuos afectados de carcinoma renal convencional (Pool 1), RNA total procedente de 1 muestra de tejido neoplásico de riñón de 1 individuo afectado de carcinoma renal cromóforo (Muestra #9), y, como control negativo, con mezclas equimolares de RNAs totales procedentes de un conjunto de muestras de tejido no neoplásico de riñón de individuos afectados de oncocitoma renal, carcinoma renal convencional y carcinoma renal cromóforo (Pool 2) (Tabla 2).

15



**Tabla 3. Descripción de las muestras de tejido de riñón analizadas**

	Oncocitoma renal	Carcinoma renal convencional	Carcinoma renal Cromóforo
Muestras de tejido neoplásico	#12	Pool 1	#9
Muestras de tejido no neoplásico	Pool 2		

### 5 *Síntesis del cRNA*

El RNA total de cada una de las biopsias se obtuvo homogenizando el tejido en TRIzol® Reagent (Life Technologies), siguiendo las recomendaciones del proveedor. El RNA total resultante se limpió con el kit Rneasy (QIAGEN) (Chomczynski P. et al., Anal. Biochem., 1987, 162: 156; Chomczynski P., Biotechniques, 1993, 15: 532). De cada preparación de RNA total se usaron 10 µg como material de partida para la síntesis de la primera hebra de cDNA con la enzima transcriptasa inversa SuperScript™ II RNase (Life Technologies), usando como cebador un oligonucleótido oligo-dT que contenía la secuencia del promotor de la RNA polimerasa del fago T7. La segunda hebra de cDNA se sintetizó utilizando los enzimas DNA polimerasa I de *E. coli* (Invitrogen Life Technologies), DNA ligasa de *E. coli* (Invitrogen Life Technologies), Rnasa H de *E. coli* (Invitrogen Life Technologies), y DNA polimerasa del fago T4 (Invitrogen Life Technologies). El cRNA marcado con biotina se sintetizó usando el kit ENZO BioArray™ HighYield™ Transcript Labeling Kit (Enzo Diagnostics Inc). Después de la transcripción *in vitro*, se eliminaron los nucleótidos no incorporados usando las columnas Rneasy (QIAGEN).

### 20 *Hibridación y escaneado del array*

Se fragmentaron 15 µg de cada cRNA biotinilado a 94°C durante 35 minutos en una solución tampón que contenía 40 mM Tris-Acetato (pH 8.1), 100mM KOAc y 30mM MgOAc. El cRNA fragmentado se mezcló con buffer de hibridación (100mM MES, 1M NaCl, 20 mM EDTA, 0.01% Tween 20) y se calentó a 99° durante 5 minutos y posteriormente a 45° durante 5 minutos, para a continuación ser cargado en el array de

Affymetrix. El primer array en el que se realizó la hibridación fue el Test 3 de Affymetrix. Este array permite testar la calidad del RNA previo al análisis de expresión en el Affymetrix® GeneChip® *Human Genome* 95 A (HG-U95A).

Para la hibridación, los arrays se incubaron en un horno rotatorio a 45° durante 16 horas y con una rotación constante de 60 rpm.

El lavado y tinción de cada array se llevó a cabo en la Estación de Fluidos de Affymetrix®. Se usó un programa de lavado y tinción que incluía:

-10x2 ciclos de lavado con SSPE-T 6x (0.9 M NaCl, 60 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6 mM EDTA, 0.01% Tween 20) a 25°,

-4x15 ciclos con 0.1 mM MES, 0.1M NaCl, 0.01% Tween 20 a 50° ,

-Tinción del cRNA biotinilado con un conjugado estreptavidina-ficoeritrina (10 µg/ml Molecular Probes)

-10x4 ciclos de lavado con SSPE-T a 25°

-Tinción con un anticuerpo anti-estreptavidina durante 10 minutos

-Tinción un conjugado estreptavidina-ficoeritrina (1 mg/ml, Molecular Probes) durante 10 minutos

-15x4 ciclos de lavado con SSPE-T a 30°

Los arrays se escanearon a 560 nm usando un microscopio confocal que utiliza emisión láser (Agilent GeneArray Scanner). El análisis de las lecturas de intensidad se realizó con el software Microarray Suite 5.0. Para la comparación de arrays, éstos fueron escalados a una intensidad total de 100.

## 1.2. Resultados.

25

El análisis diferencial de la expresión del gen *plexina-B1* en los tejidos neoplásicos frente a los tejidos control, no neoplásicos, se realizó a partir de los datos de comparación de arrays obtenidos utilizando el software de Affymetrix. Los parámetros que se tuvieron en cuenta (en el orden en el que aparecen en la lista) fueron: i) Detección. Indica si el transcrito está Presente (P), Ausente (A) o Marginal (M), ii) Cambio: Indica si la expresión de un determinado transcrito Aumenta (I), Decrece (D), No Cambia (NC),

30

Aumenta Marginalmente (MI), o Decrece Marginalmente (MD), iii) Signal Log Ratio (SLR): Indica el nivel de cambio de expresión entre la línea base (control) y una muestra problema. Este cambio se expresa como el  $\log_2$  del ratio (*fold change* o número de veces que la expresión del gen está elevada o reprimida en la muestra problema-tumoral frente a la muestra control-sana). Se considera significativo un valor de SLR de 1 (equivalente a un *fold change* de 2), para transcritos cuya expresión aumenta frente al control) y de -1, para transcritos cuya expresión disminuye frente al control.

El análisis diferencial de la expresión del gen *plexina-B1* en los estadios tumorales con respecto al control, demostró que los niveles de expresión del gen *plexina-B1* estaban reprimidos en el tejido neoplásico de riñón, respecto al tejido no neoplásico, y que esa represión era mayor, cuanto mayor era la malignidad del tumor analizado: el nivel de represión era mayor de 2 veces ( $SLR < -1$ ) en biopsias de oncocitomas renales (benignos), mayor de 4 veces ( $SLR < -2$ ) en biopsias de carcinomas renales convencionales (malignos) y mayor de 8 veces ( $SLR < -3$ ) en biopsias de carcinomas renales cromófobos (mayor grado de malignidad) (Tabla 3).

**Tabla 4. Resultados obtenidos para Plexin B1. N. Acc. AB007867**

<b>Oncocitoma vs Control</b>				
Affy Seq	Detección Pool 2	Detección #12	SLR #12 vs Pool 2	CAMBIO #12 vs Pool
33783_at	P	A	-1,2	D
<b>Carcinoma convencional vs Control</b>				
Affy Seq	Detección Pool 2	Detección Pool 1	SLR Pool 1 vs Pool 2	CAMBIO Pool 1 vs Pool
33783_at	P	A	-2,4	D

#### **Carcinoma cromófobo vs Control**

Affy Seq	Detección Pool 2	Detección Muestras #9	SLR #9 vs Pool 2	CAMBIO #9 vs Pool
33783_at	P	A	-3,6	D

**Ejemplo 2.- Análisis diferencial de expresión del gen *plexina-B1* en muestras de tejido de Riñón, utilizando la técnica de RT-PCR cuantitativa a tiempo real.**

## 5 2.1. Materiales y métodos

Para determinar los niveles de expresión del gen *plexina-B1*, se realizó una RT-PCR cuantitativa a tiempo real en un 7000 *Sequence Detection System* utilizando una mezcla *SYBR green PCR master mix* (Applied-Biosystems, Foster City, EE.UU.). El RNA total se extrajo de biopsias individuales usando el reactivo Trizol™ Reagent (Life Technologies, EE.UU.), siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante; este RNA total se purificó a continuación con el kit *Qiagen Mini Kit spin columns* (Qiagen, EE.UU.). La integridad del RNA se confirmó por electroforesis en un gel de agarosa 1% y el RNA se cuantificó espectrofotométricamente. A continuación, se digirieron 5 µg de RNA total con DNasa I (1.2 uu/µg RNA) y se procedió a la síntesis del cDNA siguiendo el siguiente protocolo: Un µg de RNA tratado con DNasa se mezcló, en un volumen total de 20 µl, con la transcriptasa reversa *SuperScript™ Rnase H-Reverse Transcriptase* (Invitrogen, EE.UU.) (400 units/µg RNA) y con 100 pmoles de oligodT. El cDNA sintetizado se amplificó utilizando cebadores específicos del gen humano *plexina-B1* (5'-ACAGTGTGACAGGCAAGGCC-3', y 5'-CACAGCCAATAGTGCATTCAAGG-3'), y cebadores específicos del gen humano gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa (*gapdh*). A continuación, se calculó, como medida relativa de la expresión génica, la relación entre la abundancia de mRNAs transcritos de *plexina-B1* y la abundancia de transcritos de *gapdh*:  $2^n$ , donde n es el valor  $C_t$  (*threshold cycle*) de *gapdh* menos el valor  $C_t$  de *plexina-B1*, y se normalizó el dato de la relación, en base al valor de la muestra con el nivel más bajo de expresión de *plexina-B1*. La especificidad de los productos de PCR se determinó por análisis de curvas de desnaturalización. Para cada secuencia génica, se construyó una curva patrón realizada con diluciones seriadas de cDNA; a las concentraciones de cDNA molde para las reacciones en la curva patrón se les dieron valores arbitrarios 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125 and 0.15625. Las reacciones de PCR en tiempo real se prepararon utilizando el kit *LightCycler-FastStart DNA master SYBR Green I kit* (Roche, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. El programa de amplificación consistía en 1 ciclo de 95°C

durante 1 min ("hot start") seguido de 45 ciclos de 95°C (desnaturalización) durante 10 seg, 60°C (anillamiento) durante 5 seg, 72°C (amplificación y adquisición) durante 10 seg. El programa de análisis de curvas de desnaturalización consistía en un ciclo de un pulso de 95°C, 65°C durante 15 seg, y un pulso de 95°C durante el paso de amplificación y adquisición.

La eficiencia de amplificación se calculó para cada reacción de PCR a partir de los datos de la curva patrón,, utilizando la ecuación:

$$E = 10^{-1/\text{slope}} \quad [1]$$

donde  $E$  es la eficiencia de amplificación.

La relación de los valores de expresión génica se determinó por la ecuación:

$$\text{Ratio} = \frac{E_{\text{target}}^{-(C_p \text{ target control} - C_p \text{ target sample})}}{E_{\text{reference}}^{-(C_p \text{ reference control} - C_p \text{ reference sample})}} \quad [2]$$

donde  $E$  es la eficiencia de amplificación,  $C_p$  es el punto de cruce, *target* es *plexina-B1*, *reference* es GAPDH, *control* es la muestra sana y *sample* es la muestra tumoral.

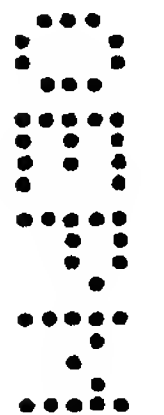
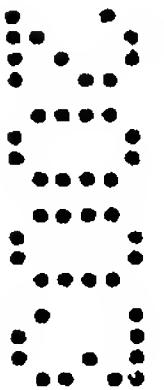
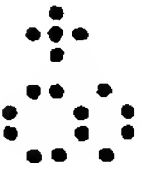
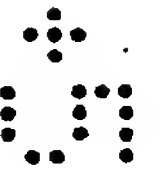
## 2.2. Resultados

Se construyeron las curvas de amplificación y desnaturalización de los genes diana (*target*, *plexina-B1*) y de referencia (*reference*, *gadph*); en la curva de desnaturalización se veía un único pico definido a la temperatura correspondiente a la temperatura de desnaturalización de cada producto, lo que indicaba que las reacciones eran específicas (datos no mostrados). Cada muestra se analizó por triplicado para calcular el cambio relativo en los niveles de expresión génica utilizando las ecuaciones 1 y 2 descritas en el apartado anterior. Los cambios en los niveles de expresión del gen *plexina-B1* están descritos en la tabla 4. De las muestras neoplásicas analizadas, sólo una mostró niveles de expresión génica superiores a los niveles en las muestras no neoplásicas; en los demás casos, que incluían muestras de carcinoma renal convencional, papilar y cromóforo, los



niveles de expresión estaban claramente reprimidos respecto a las muestras procedientes de tejido no neoplásico (Figura 1).

5



## REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para detectar la presencia de un carcinoma en un individuo, para determinar el estadio o la severidad de dicho carcinoma en el individuo, o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un individuo que presente dicho carcinoma, que comprende:

- a) la detección y/o cuantificación de la proteína Plexina-B1, del mRNA del gen *plexina-B1* o el correspondiente cDNA en una muestra de dicho individuo, y
- b) la comparación de la cantidad de proteína Plexina-B1, de la cantidad de mRNA del gen *plexina-B1* o de la cantidad del correspondiente cDNA detectada en una muestra de un individuo; con la cantidad de proteína *plexina-B1*, con la cantidad del mRNA del gen *plexina-B1* o con la cantidad del correspondiente cDNA detectada en las muestras de individuos control o en muestras anteriores del mismo individuo o con los valores normales de referencia.

2. Método según la reivindicación 1 en el que dicho carcinoma es un cáncer de riñón.

3. Método según la reivindicación 1 en el que dicha muestra es una muestra de tejido de riñón.

4. Método según la reivindicación 3 en el que dicha muestra de tejido de riñón a analizar se obtiene por cualquier método convencional, preferiblemente nefrectomía.

5. Método según la reivindicación 1 en el que dicha muestra es una muestra de orina, sangre, plasma, suero, líquido pleural, líquido ascítico, líquido sinovial, bilis, semen, jugo gástrico o líquido cefalorraquídeo.

6. Método según la reivindicación 1, en el que dicha muestra a analizar se obtiene de un individuo al que no se le ha diagnosticado previamente carcinoma.

5 7. Método según la reivindicación 1, en el que dicha muestra a analizar se obtiene de un individuo al que se le ha diagnosticado previamente carcinoma.

8. Método según la reivindicación 1, en el que dicha muestra a analizar se obtiene de un individuo en tratamiento, o que ha sido tratado previamente, contra  
cáncer.

10

9. Método según la reivindicación 1 caracterizado porque comprende la realización de una extracción de la muestra, bien para obtener un extracto de proteínas o bien para obtener un extracto que consiste en el RNA total.

15

10. Método según la reivindicación 9 caracterizado porque la detección de la proteína Plexina-B1 comprende una primera etapa de puesta en contacto del extracto de proteínas de la muestra con una composición de uno o más anticuerpos específicos contra uno o más epítopos de la proteína Plexina-B1, y una segunda etapa de cuantificación de los complejos formados por los anticuerpos y la proteína  
20 Plexina-B1.

20

11. Método según la reivindicación 10 caracterizado porque dichos anticuerpos comprenden anticuerpos monoclonales, policlonales, intactos o fragmentos recombinantes de ellos, combibodies y fragmentos Fab o scFv de  
25 anticuerpos, específicos contra la proteína Plexina-B1; siendo estos anticuerpos humanos, humanizados o de origen no humano.

25

12. Método según las reivindicaciones 10 ó 11 caracterizado porque para la cuantificación de los complejos formados por los anticuerpos y la proteína Plexina-B1 se utilizan técnicas seleccionadas del grupo formado por: Western-blot, ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay o ensayo de inmunosorbente ligado a enzima), RIA (Radioinmunoassay o Radioinmunoensayo), EIA Competitivo  
30

30

(Competitive Enzyme Immunoassay o Inmunoensayo Enzimático Competitivo), DAS-ELISA (Double antibody Sandwich-ELISA o ensayo ELISA Sándwich con Doble Anticuerpo), técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, técnicas basadas en el empleo de biochips o microarrays de proteínas que incluyan anticuerpos específicos, ensayos basados en precipitación con oro coloidal en formatos tales como dipsticks; o mediante técnicas de cromatografía de afinidad, ensayos de unión a ligando o ensayos de unión a lectina.

13. Método según la reivindicación 9 caracterizado porque la detección del mRNA o del correspondiente cDNA del gen *plexina-B1* comprende una primera etapa de amplificación del mRNA, incluido en el extracto de RNA total, o del correspondiente cDNA sintetizado por retrotranscripción del mRNA, incluido en el extracto de RNA total, y una segunda etapa de cuantificación del producto de la amplificación del mRNA o del cDNA del gen *plexina-B1*.

14. Método según la reivindicación 13 caracterizado porque la amplificación se realiza de manera cualitativa o cuantitativa, mediante RT-PCR usando oligonucleotidos cebadores, siendo las secuencias de los cebadores utilizados 5'-ACAGTGTGACAGGCAAGGCC-3', y 5'-CACAGCCAATAGTGCATTCAAGG-3'.

15. Método según la reivindicación 9 caracterizado porque la detección se realiza con sondas específicas del mRNA o del correspondiente cDNA del gen *plexina-B1*, mediante técnicas como por ejemplo Northern-blot o transferencia Northern.

16. Método según la reivindicación 9 caracterizado porque la detección del mRNA se efectúa mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real (Q-PCR).

17. Uso de secuencias nucleotídicas o peptídicas derivadas del gen *plexina-B1* para detectar *in vitro* la presencia de un carcinoma en un individuo, para determinar *in vitro* el estadio o la severidad de dicho carcinoma en el individuo, o

para monitorizar *in vitro* el efecto de la terapia administrada a un individuo que presente dicho carcinoma.

5 18. Método *in vitro* para identificar y evaluar la eficacia de compuestos para terapia del cáncer; preferiblemente para el cáncer de riñón, que comprende:

- 10 a) poner en contacto un cultivo de células tumorales; preferiblemente de riñón, con el compuesto candidato, en las condiciones y durante el tiempo apropiados para permitir que interaccionen,
- b) detectar y cuantificar los niveles de expresión del gen *plexina-B1* o la proteína Plexina-B1, y
- c) comparar dichos niveles de expresión con los de cultivos control de células tumorales sin tratar con el compuesto candidato.

15 19. Uso de secuencias nucleotídicas o peptídicas derivadas del gen *plexina-B1*, en métodos de búsqueda, identificación, desarrollo y evaluación de la eficacia de compuestos para terapia del cáncer, preferiblemente del cáncer de riñón.

20 20. Agentes caracterizados porque inducen la expresión y/o la actividad de la proteína Plexina-B1, o porque inhiben los efectos carcinogénicos de la represión de la expresión de la proteína Plexina-B1.

21. Agentes según la reivindicación 19 seleccionados del grupo formado por:

- 25 a) vectores recombinantes que expresan la proteína Plexina-B1,
- b) agentes citotóxicos, tales como toxinas, moléculas con átomos radiactivos, o agentes quimio-terapéuticos, entre los que se incluyen, sin limitación, pequeñas moléculas orgánicas e inorgánicas, péptidos, fosfopéptidos, moléculas antisentido, ribozimas, moléculas de triple hélice, RNA de doble hebra, etc., que inhiben los efectos carcinogénicos de la represión de la expresión y/o de la actividad de la proteína Plexina-B1, y
- 30 c) compuestos agonistas de la proteína Plexina-B1, que inducen, mimetizan o reemplazan una o más de las funciones de la proteína Plexina-B1.



22. Agentes según las reivindicaciones 20 ó 21 para el tratamiento del cáncer; preferiblemente para el cáncer de riñón.

5

23. Proteína Plexina-B1 para el tratamiento del cáncer; preferiblemente para el cáncer de riñón.

10

24. Uso de los agentes según las reivindicaciones 20 ó 21 en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de cáncer; preferiblemente para el cáncer de riñón.

25. Uso de la proteína Plexina-B1 en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de cáncer; preferiblemente para el cáncer de riñón.

15

26. Composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o varios agentes según las reivindicaciones 19 ó 20 junto con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

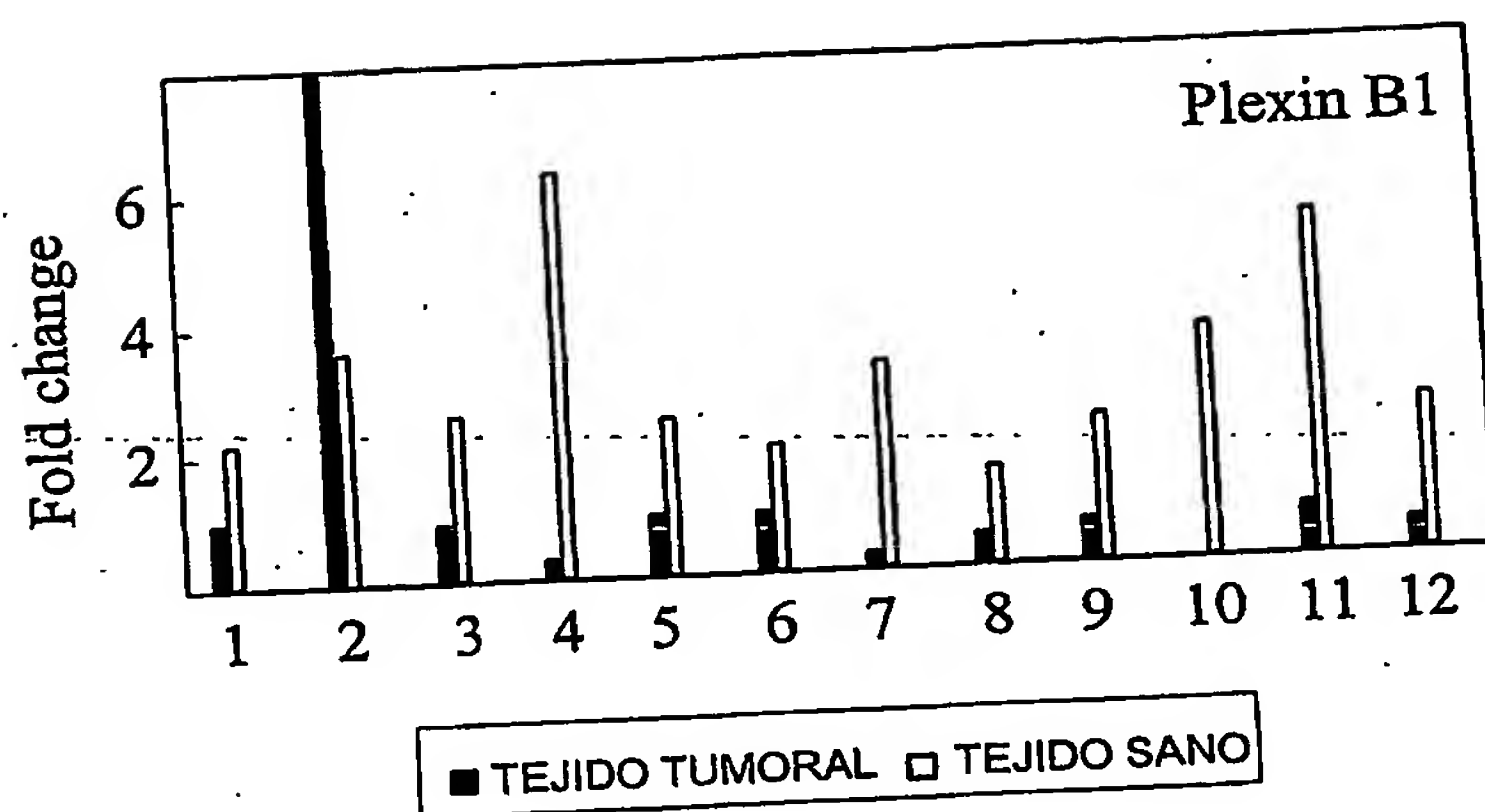
20

27. Composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína Plexina-B1 junto con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

25

28. Composición farmacéutica según las reivindicaciones 26 y 27 caracterizada porque contiene otro ingrediente activo, preferiblemente uno que induzca la función de la proteína Plexina-B1.

FIGURA 1



PCT/EP2004/007195



BW1

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**